

聚酰胺分离低极性萜类成分和脂溶性色素的应用研究

韩曼飞,张刘强*,李医明*

上海中医药大学中药学院,上海 201210

摘要:以穿心莲、冬凌草、银杏叶、枇杷叶 4 种含有不同萜类化合物的中草药为试材,在乙醇-水体系下,运用聚酰胺柱色谱对茎叶类中药中低极性萜类成分和脂溶性色素进行分离研究。实验结果表明,聚酰胺柱层析法可安全有效脱去脂溶性色素,而达到富集低极性萜类化合物的效果。这可解决硅胶等柱色谱进行此类成分分离所带来的安全性和分离效果差的问题,同时为萜类成分的产业化富集提供了新的方法。

关键词:聚酰胺;醇水体系;萜类化合物;脂溶性色素;分离纯化

中图分类号:R932

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.10.017

Application of Separation Lower Polar Terpenoids and Lipophilic Pigment by Polyamide

HAN Man-fei, ZHANG Liu-qiang*, LI Yi-ming*

College of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201210, China

Abstract: To isolate lower polar terpenoids and lipophilic components from aerial part of *Andrographis paniculata* and *Rabdosia rubescens*, from leaves of *Ginkgo biloba* and *Eriobotrya japonica* by polyamide column chromatography, using the ethanol-water system. The result showed that lipophilic pigment could safely and effectively be taken off, and the lower polar terpenoids could be enriched through polyamide column chromatography. The above work will help to solve the problem of resolution and safety induced by other column chromatography, and to provide a new method for the industrialized enrichment of terpenoids.

Key words: polyamide; ethanol-water system; terpenoids; lipophilic pigment; purification

聚酰胺(Polyamide)是由酰胺聚合而成的一类高分子物质,商品名:锦纶、尼龙。早期聚酰胺种类繁多,目前市场上最常用于层析的是锦纶6(聚己内酰胺)。自1955年发现聚酰胺层析分离酚性物质以来,研究人员利用氢键吸附作用,现已将其发展成为分离黄酮、酚类、醌类等物质的优先方法^[1]。随着聚酰胺层析的不断发展,研究人员逐渐意识到聚酰胺的“双重色谱”的性能。因聚酰胺分子中既有非极性脂肪链,又有极性酰胺基团,在分离黄酮及其苷类时,当用含水溶剂体系时,聚酰胺的层析行为类似于反相分配层析,黄酮苷的极性大于其苷元而先被洗脱下来;当用有机溶剂体系时,其层析行为类似于正相分配层析,黄酮苷元的极性小而先被洗脱^[2,3]。因此,聚酰胺亲水和亲脂性能均较好。

脂溶性色素是广泛存在于植物中的一种小极性成分,主要有叶绿素a(图1)、叶绿素b(图1)、类胡萝卜素等,它们不溶于水可溶于有机溶剂。在地上部位中药材中,萜类、甾体等低极性成分往往和叶绿素等脂溶性色素相伴,对地上部位类中药中小极性成分的分离纯化具有较大影响。目前,主要通过石油醚萃取法、活性炭层析法、硅胶和Sephadex LH-20柱层析法等脱除脂溶性的色素^[4,5]。但是,石油醚萃取法和活性炭法脱色选择性差,低极性的萜类或甾体化合物会和脂溶性色素会一起被萃取或损失^[6,7]。硅胶、Sephadex LH-20柱色谱进行非酚性低极性成分的脱色处理是目前最常用的,然而硅胶难以将脂溶性色素从该类低极性成分中完全去除,往往需要sephadex LH-20柱层析继续纯化处理,而该填料价格昂贵。在以往的聚酰胺层析应用中,此类成分也可适用,但均采用非极性溶剂系统^[8,9]。目前,本课题组在中药化学成分的提取分离过程中发现,在醇水体系下,聚酰胺对脂溶性色素具有极好的

收稿日期:2017-11-22 接受日期:2018-03-13

基金项目:国家自然科学基金(81673570);上海市优秀学术带头人计划(16XD1403500);上海市“中药药效物质”E-研究院项目

*通信作者 Tel:86-21-51322191; E-mail: ymLius@163.com

吸附能力,而对萜类、甾体等非酚性的低极性成分吸附能力较弱,从而有助于该类成分的富集纯化。除此之外,聚酰胺还具有价格低廉和可重复利用等特点,解决了活性炭和硅胶柱层析法除色素过程中存在的一些不足或弊端。

目前常用的脂溶性色素含量测定方法主要有分光光度计法、高效液相色谱法和活体叶绿素仪法等。其中,分光光度计法应用较为广泛^[10,11]。本实验采用分光光度计法测定各种中药提取液及聚酰胺柱色谱法相应洗脱流份中脂溶性色素的含量,在此基础上,运用薄层色谱法对中草药中的主要萜类成分进行追踪,便于脂溶性色素的脱除考察^[12]。

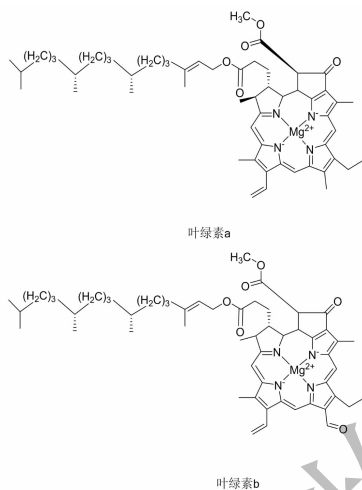


图1 叶绿素 a 和叶绿素 b 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of chlorophyll a and chlorophyll b

1 实验材料

枇杷叶(上海康桥中药饮片有限公司,批号 170309);冬凌草(上海康桥中药饮片有限公司,批号 170407);穿心莲(上海康桥中药饮片有限公司,批号 160203);银杏叶(上海康桥中药饮片有限公司,批号 151121);穿心莲内酯(实验室自制,纯度 $\geq 98\%$);脱水穿心莲内酯(实验室自制,纯度 $\geq 98\%$);冬凌草甲素(上海诗丹德生物技术有限公司);白果内酯(TCI 化成工业发展有限公司);槲皮素(上海同田生物技术有限公司);熊果酸(Adamas 试剂)。

紫外-可见分光光度计(Agilent 8453);ZF-20C 暗箱式紫外分光光度计;EYEL4 型旋转蒸发仪;聚酰胺粉(100~200目)(国药集团化学试剂有限公司);95%乙醇(合成级,国药集团化学试剂有限公司);甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);浓硫酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙

酸酐(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2 实验方法

2.1 样品提取液制备

称取穿心莲(冬凌草、银杏叶、枇杷叶)药材 100 g,按体积比加入 9 倍量 95%乙醇,置于 80 °C 条件下回流提取 3 次,每次 2 h。趁热抽滤,将滤液合并旋转回收溶剂至一定体积,备用。

2.2 聚酰胺柱预处理

取聚酰胺粉 28 g,用 95%乙醇浸泡 12 h 并不断搅拌,装柱让其自然沉降。用 3~5 倍量柱体积的 95%乙醇洗脱,洗至洗脱液透明。再用 3~5 倍量蒸馏水洗脱,洗至洗脱液无醇味,备用。

2.3 样品用聚酰胺分离

从穿心莲(冬凌草、银杏叶、枇杷叶)提取液中定量移取 5 mL,与聚酰胺拌样上柱。后依次用 300 mL 水、300 mL 20%乙醇、300 mL 40%乙醇、300 mL 60%乙醇、300 mL 80%乙醇以及 300 mL 95%乙醇洗脱。

2.4 待测样品制备

从穿心莲(冬凌草、银杏叶、枇杷叶)提取液中移取 0.5 mL 并稀释至 30 mL,取 5 mL 稀释液减压蒸干,用 95%乙醇溶解并定容至 5 mL 作为未上样待测样品。从水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇及 95%乙醇洗脱液中依次取 5 mL 减压蒸干,用 95%乙醇溶解并定容至 5 mL 作为待测样品。每个待测样品准备 3 份,在 470、649、655 nm 下测定吸光值。

2.5 测定方法

95%空白乙醇做参比液,分别在 470、649、655 nm 下测定样品液吸光值,并且按以下公式计算样品叶绿素含量:

$$C_a = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649} \quad (1)$$

$$C_b = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665} \quad (2)$$

$$C_x = (1000 \times A_{470} - 2.05 \times C_a - 114 \times C_b) / 245 \quad (3)$$

公式中, C_a 为叶绿素 a 含量, C_b 为叶绿素 b 含量, C_x 为类胡萝卜素含量^[13]。

3 结果与分析

3.1 穿心莲

在波长 470、649、655 nm 处测定样品液吸光值,每个样品平行测 3 次,结果见表 1。根据公式(1)、(2)、(3)计算样品中叶绿素含量和类胡萝卜素含量,结果见表 2。

表1 穿心莲各洗脱流份样品的吸光值($\bar{x} \pm s$)Table 1 The absorbance of each fraction of *Andrographis paniculata* ($\bar{x} \pm s$)

检测波长 Detection wavelength (nm)	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	穿心莲提取液 Extract of <i>A. paniculata</i>
649	0 ± 0	0.004 ± 0	0.006 ± 0.001	0.013 ± 0.002	0.040 ± 0.007	0.307 ± 0.011	1.455 ± 0.009
665	0.001 ± 0	0.004 ± 0	0.006 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.040 ± 0.007	0.438 ± 0.011	2.153 ± 0.004
470	0.007 ± 0	0.002 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.035 ± 0.002	0.301 ± 0.008	0.706 ± 0.033	2.724 ± 0.043

将表1中测定的吸光值计算出叶绿素含量和类胡萝卜素含量,并求出标准差,结果见表2。

表2 穿心莲各洗脱流份样品中叶绿素含量和类胡萝卜素含量($\bar{x} \pm s$)Table 2 The content of chlorophyll and carotenoids in each fraction of *A. paniculata* ($\bar{x} \pm s$)

脂溶性色素 Lipophilic pigments	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	穿心莲提取液 Extract of <i>A. paniculata</i>
叶绿素含量 Chlorophyll content	0.011 ± 0.002	0.095 ± 0.001	0.155 ± 0.015	0.314 ± 0.059	0.999 ± 0.185	8.455 ± 0.266	40.59 ± 0.189
叶绿素百分比 Percentage of chlorophyll	0.1%	0.9%	1.5%	3.1%	10.0%	84.3%	-
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	0.029 ± 0	0 ± 0.005	0 ± 0.007	0.036 ± 0.012	0.896 ± 0.031	0.858 ± 0.054	1.386 ± 0.121
类胡萝卜素百分比 Percentage of carotenoids	1.6%	0	0	2.0%	49.3%	47.2%	-

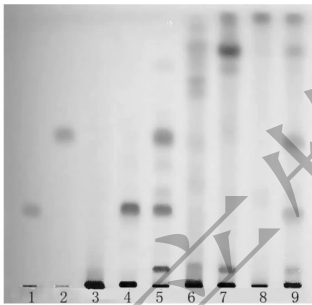


图2 穿心莲各洗脱流份和穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯的薄层色谱图

Fig. 2 Thin layer chromatographic analysis of andrographolide, dehydroandrographolide, and each fraction of *A. paniculata*

注:1 穿心莲内酯;2 脱水穿心莲内酯;3 水部位;4 20% 部位;5 40% 部位;6 60% 部位;7 80% 部位;8 95% 部位;9 穿心莲提取液。
Note :1 Andrographolide;2 Dehydroandrographolide;3 water eluate;4 20% eluate;5 40% eluate;6 60% eluate;7 80% eluate;8 95% eluate;9 Extract of *A. paniculata*.

由表2看出,聚酰胺层析柱可把穿心莲中大部分脂溶性色素集中于80%乙醇和95%乙醇部位,且叶绿素主要集中于95%乙醇部位,类胡萝卜素主要集中于80%乙醇和95%乙醇部位。

对穿心莲各流份进行TLC板检测,20%硫酸乙醇显色,结果见图2。

由TLC检测结果发现,穿心莲经过聚酰胺层析柱分离,其指标成分主要集中于20%和40%部分,可很好的与脂溶性色素分离。

3.2 冬凌草

在波长470、649、655 nm处测定样品液吸光值,结果见表3。根据公式(1)、(2)、(3)计算样品中叶绿素含量,结果见表4。

将表3中测定的吸光值计算出叶绿素含量和类胡萝卜素含量,并求出标准差,结果见表4。

表3 冬凌草各洗脱流份样品的吸光值($\bar{x} \pm s$)Table 3 The absorbance of each fraction of *Rabdosia rubescens* ($\bar{x} \pm s$)

检测波长 Detection wavelength (nm)	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	冬凌草提取液 Extract of <i>R. rubescens</i>
649	0 ± 0	0.003 ± 0	0.006 ± 0	0.016 ± 0.003	0.013 ± 0.003	0.517 ± 0.008	1.215 ± 0.018
665	0 ± 0	0.003 ± 0.001	0.006 ± 0	0.016 ± 0.003	0.015 ± 0.001	1.16 ± 0.018	2.141 ± 0.019
470	0.001 ± 0	0.007 ± 0.002	0.018 ± 0.003	0.043 ± 0.008	0.732 ± 0.005	0.883 ± 0.016	3.075 ± 0.161

表4 冬凌草各洗脱流份样品中叶绿素含量和类胡萝卜素含量($\bar{x} \pm s$)Table 4 The content of chlorophyll and carotenoids in each fraction of *R. rubescens* ($\bar{x} \pm s$)

脂溶性色素 Lipophilic pigments	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	冬凌草提取液 Extract of <i>R. rubescens</i>
叶绿素含量 Chlorophyll content	0 ± 0.01	0.08 ± 0.017	0.154 ± 0.01	0.397 ± 0.062	0.341 ± 0.058	17.046 ± 0.268	36.156 ± 0.434
叶绿素百分比 Percentage of chlorophyll	0	0.4%	0.9%	2.2%	1.9%	94.6%	—
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	0.026 ± 0.004	0.001 ± 0.012	0.021 ± 0.018	0.037 ± 0.036	2.883 ± 0.052	1.442 ± 0.034	5.555 ± 0.505
类胡萝卜素百分比 Percentage of carotenoids	0.6%	0	0.5%	0.8%	65%	32.7%	—

由表4看出,聚酰胺层析柱可集中冬凌草中部分大脂溶性色素于80%乙醇和95%乙醇部位,且叶色素主要集中于95%乙醇洗脱流份中,类胡萝卜素主要集中于80%乙醇和95%乙醇洗脱流份中。

对冬凌草各流份进行TLC板检测,20%硫酸乙醇显色,结果见图3。

由TLC检测结果发现,冬凌草经过聚酰胺层析柱分离,其指标成分冬凌草甲素主要集中于20%部分。

3.3 银杏叶

在波长470、649、655 nm处测定样品液吸光值,结果见表5。根据公式(1)、(2)、(3)计算样品中叶绿素含量,结果见表6。

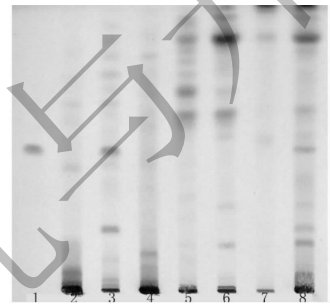


图3 冬凌草各洗脱流份和冬凌草甲素薄层色谱图

Fig. 3 Thin layer chromatographic analysis of oridonin and each fraction of *R. rubescens*

注:1 冬凌草甲素;2 水部位;3 20% 部位;4 40% 部位;5 60% 部位;6 80% 部位;7 95% 部位;8 冬凌草提取液。

Note : 1 Oridonin; 2 water eluate; 3 20% eluate; 4 40% eluate; 5 60% eluate; 6 80% eluate; 7 95% eluate; 8 Extract of *R. rubescens*.

表5 银杏叶各洗脱流份样品的吸光值($\bar{x} \pm s$)Table 5 The absorbance of each fraction of the *Ginkgo biloba* ($\bar{x} \pm s$)

检测波长 Detection wavelength (nm)	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	银杏叶提取液 Extract of <i>G. biloba</i>
649	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0	0.002 ± 0	0.013 ± 0.001	0.020 ± 0.002	0.593 ± 0.015	1.792 ± 0.066
665	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0	0.002 ± 0	0.013 ± 0.001	0.033 ± 0.004	1.733 ± 0.040	2.982 ± 0.063
470	0.004 ± 0	0.020 ± 0.004	0.013 ± 0	0.039 ± 0.002	0.385 ± 0.007	0.702 ± 0.025	2.985 ± 0.206

将表5中测定的吸光值计算出叶绿素含量及标准差,结果见表6。

表6 银杏叶各洗脱流份样品中叶绿素含量和类胡萝卜素含量($\bar{x} \pm s$)Table 6 The content of chlorophyll and carotenoids in each fraction of *G. biloba* ($\bar{x} \pm s$)

脂溶性色素 Lipophilic pigments	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	银杏叶提取液 Extract of <i>G. biloba</i>
叶绿素含量 Chlorophyll content	0.15 ± 0.021	0.124 ± 0	0.049 ± 0	0.329 ± 0.038	0.653 ± 0.076	22.209 ± 0.535	52.176 ± 1.617
叶绿素百分比 Percentage of chlorophyll	0.6%	0.5%	0.2%	1.4%	2.8%	94.5%	0
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	0 ± 0	0.042 ± 0.016	0.037 ± 0	0.048 ± 0.011	1.403 ± 0.029	1.714 ± 0.064	1.279 ± 0.294

续表 6 (Continued Tab. 6)

脂溶性色素 Lipophilic pigments	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	银杏叶提取液 Extract of <i>G. biloba</i>
类胡萝卜素百分比 Percentage of carotenoids	0	1.3%	1.1%	1.5%	43.2%	52.8%	-

由表 6 看出,聚酰胺层析柱可集中银杏叶中部分大脂溶性色素于 80% 乙醇和 95% 乙醇部位,且叶色素主要集中于 95% 乙醇洗脱流份中,类胡萝卜素主要集中于 80% 乙醇和 95% 乙醇洗脱流份中。

对银杏叶各流份进行 TLC 板检测,366 nm 下观察荧光,结果见图 4。

由 TLC 检测结果发现,银杏叶中的倍半萜类化合物和黄酮类化合物可在聚酰胺层析柱中很好的分离开,且含有倍半萜类化合物部分只有不超过 5% 的脂溶性色素。

3.4 枇杷叶

在波长 470、649、655 nm 处测定样品液吸光值,结果见表 7。根据公式(1)、(2)、(3)计算样品中叶绿素含量,结果见表 8。

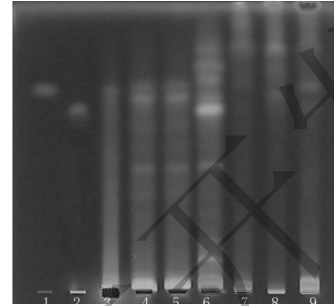


图 4 银杏叶各洗脱流份和白果内酯及槲皮素薄层色谱图
Fig. 4 Thin layer chromatographic analysis of bilobalide, quercetin, and each fraction of *G. biloba*

注:1 白果内酯;2 槲皮素;3 水部位;4 20% 部位;5 40% 部位;6 60% 部位;7 80% 部位;8 95% 部位;9 银杏叶提取液。

Note:1 Bilobalide;2 Quercetin;3 water eluate;4 20% eluate;5 40% eluate;6 60% eluate;7 80% eluate;8 95% eluate;9 Extraction of *G. biloba*.

表 7 枇杷叶各洗脱流份样品的吸光值($\bar{x} \pm s$)

Table 7 The absorbance of each fraction of the *Eriobotrya japonica* ($\bar{x} \pm s$)

检测波长 Detection wavelength (nm)	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	枇杷叶提取液 Extract of <i>E. japonica</i>
649	0.001 ± 0	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.019 ± 0.003	0.030 ± 0.003	0.449 ± 0.021	3.557 ± 0.251
665	0.001 ± 0	0.003 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.019 ± 0.003	0.036 ± 0.003	1.088 ± 0.038	3.836 ± 0.105
470	0.015 ± 0	0.016 ± 0.005	0.044 ± 0.001	0.091 ± 0.005	0.663 ± 0.014	0.365 ± 0.025	3.541 ± 0.066

将表 7 中测定的吸光值计算出叶绿素含量及标准差,结果见表 8。

表 8 枇杷叶各洗脱流份样品中叶绿素含量和类胡萝卜素含量($\bar{x} \pm s$)

Table 8 The content of chlorophyll and carotenoids in each fraction of *E. japonica* ($\bar{x} \pm s$)

脂溶性色素 Lipophilic pigments	水 Water eluate	20% eluate	40% eluate	60% eluate	80% eluate	95% eluate	枇杷叶提取液 Extract of <i>E. japonica</i>
叶绿素含量 Chlorophyll content	0.023 ± 0	0.08 ± 0.03	0.201 ± 0.019	0.473 ± 0.069	0.785 ± 0.081	15.302 ± 0.651	89.764 ± 4.918
叶绿素百分比 Percentage of chlorophyll	0.1%	0.5%	1.2%	2.8%	4.7%	90.7%	-
类胡萝卜素含量 Carotenoid content	0.054 ± 0	0.037 ± 0.028	0.108 ± 0.007	0.210 ± 0.014	2.493 ± 0.037	0.000 ± 0.067	0.000 ± 2.434
类胡萝卜素百分比 Percentage of carotenoids	1.9%	1.3%	3.7%	7.2%	85.9%	0	-

由表 8 看出,聚酰胺层析柱可集中银杏叶中部分大脂溶性色素于 80% 乙醇和 95% 乙醇部位,且叶色素主要集中于 95% 乙醇洗脱流份中,类胡萝卜素

主要集中于 80% 乙醇和 95% 乙醇洗脱流份中。

对枇杷叶各流份进行 TLC 板检测,20% 硫酸乙醇显色,结果见图 5。

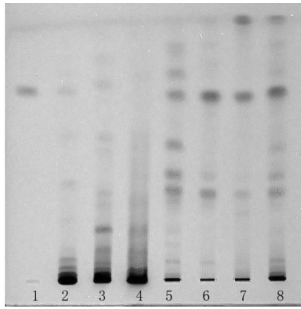


图5 枇杷叶各洗脱流份和熊果酸薄层色谱图

Fig. 5 Thin layer chromatographic analysis of uosolic acid and each fraction of *E. japonica*

注:1 熊果酸;2 水部位;3 20% 部位;4 40% 部位;5 60% 部位;6 80% 部位;7 95% 部位;9、枇杷叶提取液。

Note:1 Uosolic Acid;2 water eluate;3 20% eluate;4 40% eluate;5 60% eluate;6 80% eluate;7 95% eluate;8 Extract of *E. japonica*.

由 TLC 检测结果发现,枇杷叶经过聚酰胺层析柱分离,其主要成分三萜酸类主要集中于 60%、80% 以及 95% 部分,不能完全与样品中脂溶性色素分离。我们推测可能是枇杷叶含有三萜酸类成分都具有羧基,可与聚酰胺填料中弱碱性的酰胺基团形成化学吸附,进而造成拖尾和不能完全分离的现象。

4 讨论

萜类化合物在自然界分布极为广泛,是骨架庞大、种类繁多、具有广泛生物活性的一类重要的天然产物。除了环烯醚萜苷和三萜皂苷类成分之外,其他萜类在植物中主要以游离态形式存在,而在分离纯化过程中,这类成分往往和脂溶性色素相伴。目前中药材中脂溶性色素的去除方法主要有萃取法、硅胶柱层析法、活性炭柱层析法和凝胶柱层析法,但有些方法有的纯化效果不理想,有的需要大量使用有机溶剂会造成环境污染和人身危害,有的目标萜类成分损失较大,有的价格过于昂贵等等。在乙醇-水体系下,本实验采用聚酰胺柱层析法,对中药穿心莲、冬凌草、银杏叶以及枇杷叶进行考察,实验结果发现在 60% 乙醇体系下,绝大部分脂溶性色素仍未被洗脱,而二萜内酯类、二萜类、倍半萜类等低极性成分可与脂溶性色素达到完全分离的目的,但是含有羧基的萜类成分易发生拖尾而不太适用此方法。同时乙醇-水的洗脱体系和聚酰胺填料的重复利用,均可有效降低环境污染和生态危害。本项工作为低极性萜类成分中脂溶性色素的脱除提供了新的研究思路和方法,也进一步拓展了聚酰胺填料对低极性成分分离纯化的应用。

参考文献

- 1 Peking University Health Science Center (北京医学院). Chinese herbal medicine composition chemistry (中草药成分化学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1980; Vol I, 25.
- 2 Fang XY (方小燕). Application of polyamide resin in separation and purification of flavonoids [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2013, 25(5): 41-42.
- 3 Wang ZH (王志宏), Peng S (彭胜), Lei MS (雷明盛), et al. Hydrolyzing flavonoids and enriching flavonoid aglycones from leaves of *Eucommia ulmoides* oliv [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27: 289-293.
- 4 Xie P (谢平), Luo M (罗永明). Natural pharmaceutical chemistry experiment technology: Vol I (天然药物化学实验技术) [M]. Jiangxi: Jiangxi science and technology publishing house, 1993; 50.
- 5 Pang M (庞敏), Wang HX (王洪新), Yin F (殷飞). Purification of capsicum red pigments by saponification and silica gel column chromatography [J]. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技), 2013, 34: 305-307.
- 6 Liu L (刘莉), Luo JB (罗佳波), Xing XF (邢学锋). The application of activated carbon in paclitaxel injection [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31: 735-736.
- 7 Yuan Y (原嫒). Chemical studies on the ethyl acetate and the petroleum ether extract of *Aruncus sylvestris* [D]. Tianjin: Tianjin University (天津大学), 2013.
- 8 Ma T (马腾). Study on the chemical constituents from *Solidago canadensis* with their cytotoxicity [D]. Jinan: Jinan University (济南大学), 2011.
- 9 Jiang X (姜醒), Sun Q (孙琦), Zhu JX (朱景鑫), et al. Sesquiterpenes from *Kadsura heteroclita* Rhizome and their cytotoxic activity [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(9): 46-50.
- 10 Cui Q (崔勤), Li XL (李新丽), Zhai SZ (翟淑芝). Spectrophotometer method for the determination of the chlorophyll content of wheat [J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2006, 34: 2063-2063.
- 11 Zhang F (张伏), Zhang YK (张亚坤), Mao PJ (毛鹏军), et al. Research status and development of phytochlorophyll measurement [J]. *J Agric Mecha Res* (农机化研究), 2014: 238-241.
- 12 Lu FQ (陆凡晴), Bao B. Review on extraction and analysis method of terpenoids from plants [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 166-170.
- 13 Li HS (李合生). Principle and technology of plant physiological and biochemical experiments: Vol I (植物生理生化实验原理和技术) [M]. Shanghai: Higher Education Press, 2000: 135-138.